

**Versuche zur Anreicherung von
Kallidinogen und Kallidin**

Karl Heinz Krotsch

Druck : Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 221777

Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM LABORATORIUM DER CHIRURGISCHEN KLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. R. ZENKER

VERSUCHE ZUR ANREICHERUNG VON KALLIDINOGEN
UND KALLIDIN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl Heinz Krottsch
aus Teplitz-Schönau (CSR)

München 1959



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. Dr. E. WERLE
Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 4. August 1959

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Herrn Professor Dr. Dr. E. WERLE danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und seine wohlwollende Unterstützung bei der Ausarbeitung meiner Dissertation.

Herrn Professor Dr. E. K. FREY danke ich für den Arbeitsplatz im Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	9
Allgemeiner Teil	
1. Vorkommen und Eigenschaften des Kallikreins	9
2. Freilegung und Inaktivierung des Kallidins	11
3. Vorkommen des Kallidininaktivators	12
4. Pharmakologische und chemische Eigenschaften des Kallidins	12
5. Bradykinin und Kallidin	13
6. Bildung von Kallidin in der Blutbahn	13
Experimenteller Teil	
Biologischer Nachweis des Kallidinogens bzw. des Kallidins	14
Kriterien des Kallidins	15
A Versuche zur Anreicherung von Kallidinogen	
1. Fällung von Rinderserum mit Essigsäure	15
2. Fraktionierte Fällung mit Äthanol	18
a) Herstellung eines Trockenpräparates	19
b) Anreicherung mit Aceton	20
c) Fällung mit Kalignost	20
3. Adsorptionsversuch an Carbo activatus purissimus siccus (Merck)	21
4. Fällung mit Ammonsulfat	21
5. Fällung mit Trichloressigsäure	22
6. Fällung mit Kalignost bei verschiedenen p_H	22
7. Fällung mit Phosphorwolframsäure bei verschiedenen p_H	23
8. Versuche zur weiteren Reinigung des durch Fällung mit Phosphorwolframsäure ($p_H = 3-4$) gewonnenen Kallidino- genpräparates	23
a) Herstellung eines Acetontrockenpulvers	23
b) Fällung mit Ammonsulfat	25
9. Schema zur präparativen Gewinnung eines Kallidinogen- präparates mit Angaben von Ausbeute, Trockengewicht und Reinheitsgrad	27

B Versuche zur Gewinnung von Kallidinpräparaten

1. Darstellung von Kallidin aus Rinderserum	28
2. Weitere Reinigung der Kallidinlösung durch Fällung mit Kalignost und Aceton	31
3. Einfluss der Trichloressigsäure auf die Kallidinaus- beute	32
4. Kallidin-Adsorptionsversuche mit ionenaustauschenden Substanzen	33
a) mit Amberlite IR 4B	33
b) mit Amberlite IRC 50	33
5. Darstellung einer Kallidinlösung aus Rinderserum durch Fällung mit Trichloressigsäure	33
6. Weitere Reinigungsversuche der Kallidinlösung	36
a) Fällung mit Phosphorwolframsäure	36
b) Fällung mit Aceton	36
c) Adsorption an Carbo activatus purissimus siccus (Merck)	37
Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	41

EINLEITUNG

Blutserum dient als Ausgangsprodukt zahlreicher blutdruck-, darm- und uterusaktiver Substanzen, wie sie z.B. Kallikrein, Bradykinin, Hypertensin und Kallidin darstellen. Diese Substanzen liegen im normalen Blut in inaktiver Form vor. Durch Zugabe bestimmter Fermente, wie Trypsin oder Bothrops-jararaca-Toxin, Renin, Streptokinase oder Kallikrein, werden die genannten aktiven Substanzen aus ihren verschiedenen proteinartigen Vorstufen durch Abspaltung von Peptiden in Freiheit gesetzt. Sie können dann pharmakologisch nachgewiesen und isoliert werden.

Im Falle des Kallidins gibt es zwei Faktoren, die es verhindern, dass nach Zusatz von Kallikrein im Blutserum die theoretisch mögliche Kallidinmenge gewonnen werden kann. Erstens enthält das Blutserum einen Inaktivator für Kallikrein und zweitens einen Inaktivator für Kallidin.

Da das Blutserum Fermente enthält, die die aktiven Substanzen wieder aufspalten und so wieder inaktivieren, ist es vorteilhaft, vor der Freisetzung der aktiven Substanz durch die genannten Fermente die Inaktivatoren aus dem Serum abzutrennen oder unwirksam zu machen. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, neue Verfahren zur Anreicherung von Kallidinogenen und von Kallidin aufzufinden. Zunächst soll jedoch noch näher auf Kallikrein und seine Beziehungen zum Kallidin eingegangen werden.

ALLGEMEINER TEIL

1. Vorkommen und Eigenschaften des Kallikreins

Das von FREY und KRAUT (1925) aufgefundene Kallikrein (1)⁺ ist eine körpereigene, hochmolekulare, thermolabile Substanz, die pharmakologisch durch ihre blutdrucksenkende Wirkung charakterisiert ist. Es besitzt die Fähigkeit den isolierten Hunde- und Katzendünndarm sowie den Katzenuterus zur Kontraktion zu erregen, während es am isolierten Meerschweinchendünndarm und -dickdarm wirkungslos ist.

Nachdem Kallikrein zunächst im Säugetierharn aufgefunden worden war, konnte es später in den Speicheldrüsen und im Mundspeichel, auch im Pankreas

⁺) Weitere Literaturstellen s. (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

und Bauchspeichel sowie im Blut nachgewiesen werden. Im Pankreas, im nativen Pankreassaft und im Blut liegt das Kallikrein in inaktiver Form vor. Im Bedarfsfalle wird unter Einwirkung des im Pankreas befindlichen Trypsins, das seinerseits durch das Ferment Enterokinase aus inaktivem Trypsinogen entsteht, inaktives Kallikrein in aktives übergeführt. Durch kurzes Ansäuern und anschliessendes Neutralisieren oder durch Versetzen mit Papain oder Trypsinkinase (2) lässt sich die Aktivierung auch in vitro vollziehen.

Chemisch gesehen handelt es sich beim Kallikrein um ein Protein, das gegen Säuren und Laugen sehr empfindlich ist. Sein Molekül besitzt wahrscheinlich freie Aminogruppen, phenolische Hydroxyl- oder Karboxylgruppen und einen Phenol- oder Imidazolrest. Durch die sauren Gruppen einerseits und die basischen andererseits kann es sowohl sauer als auch basisch reagieren und hat somit die Eigenschaften eines Ampholyten. Der isoelektrische Punkt liegt bei $p_H = 4,2$. Im Wasser und in 50 prozentigem Alkohol ist es löslich, mit Sulfosalizylsäure fällbar.

Wird Kallikrein mit Blutserum vermischt, so verliert es im Verlauf einer Stunde seine pharmakologische Aktivität. Es geht mit einem Eiweisskörper des Serums, dem sog. Inaktivator (1), eine reversible Bindung ein, die am Blutdruck des Hundes und am isolierten Hundedarm wirkungslos ist. Wird nun ein Serum-Kallikrein-Ansatz etwa 1 - 3 Minuten nach der Vermischung in die Suspensionsflüssigkeit eines isolierten Hundedarms gespritzt, so ist eine Kontraktion zu beobachten. Diese setzt zum Unterschied von einer durch Kallikrein ausgelösten Kontraktion sofort ein, ist stärker, als nach der verabreichten Menge Kallikrein zu erwarten wäre, und auch am isolierten Meer-schweinchendarm auszulösen.

Genauere Untersuchungen haben ergeben, dass bei der Einwirkung von aktivem Kallikrein auf Serum folgende drei Vorgänge nach- und nebeneinander ablaufen:

1. Kallikrein bewirkt mit messbarer Geschwindigkeit die Bildung einer pharmakologisch aktiven Substanz.⁺⁾
2. Diese wird von einem im Serum vorhandenen Ferment irreversibel inaktiviert.
3. Ebenso wird das Kallikrein von einem Kallikreininaktivator reversibel gebunden. (3)

+) Diese früher als DK (darmkontrahierend) bezeichnete Substanz wird jetzt Kallidin genannt.

Diese drei Vorgänge lassen sich am isolierten Meerschweinchendarm genau beobachten.

2. Freilegung und Inaktivierung des Kallidins

Kallidin (3) geht nicht aus dem Kallikrein hervor, sondern aus einer hochmolekularen, thermolabilen Vorstufe des Blutserums, dem sog. Kallidinogen, das durch Papain und Proteinase aus Schimmelpilzen abgebaut werden kann (3) und somit als Eiweisskörper anzusprechen ist. Kallikrein kann dabei als spezifisches proteolytisches Ferment angesprochen werden, weil die Spaltung der Vorstufe durch Papain oder Proteinase nicht zu Kallidin führt. Durch Titration der freigelegten Karboxylgruppen nach WILLSTÄTTER und WALDSCHMIDT-LEITZ (4) konnte bewiesen werden, dass der Freilegungsprozess des Kallidins aus Kallidinogen durch Kallikrein eine Eiweisspaltung darstellt.

Die Inaktivierung des Kallidins ist wahrscheinlich ebenfalls ein proteolytischer Vorgang. Als Beweis dafür kann der Abbau des Kallidins durch Gewebsextrakte sowie durch die Pilzproteinase Dymal (2) angesehen werden, wobei die pharmakologische Wirkung des Kallidins verloren geht. Es wird angenommen, dass die Kallidinfreilegung eine spezifische Kallikreinwirkung ist. Die verunreinigenden proteolytischen Enzyme beim Kallikrein aus Harn, wie Pepsin, Trypsin und Kathepsin, kommen nicht in Betracht, da bei Verwendung von Casein, Gelatine oder Hämoglobin als Substrat keine Spaltung beobachtet wurde (5). Ausserdem liegt das Optimum der Kallidinentwicklung bei $p_H = 7$, also mehr oder weniger weit entfernt von den p_H Optima der genannten Enzyme. Es wurde ferner festgestellt, dass bei Zusatz von Kallikrein-Inaktivator aus Lymphknoten oder Ohrspeicheldrüsen nicht nur die pharmakologische Wirkung des Kallikreins, sondern gleichzeitig auch seine Fähigkeit zur Kallidinentwicklung aufgehoben wird (6).

Die Bildung sowie die Inaktivierung des Kallidins sind als fermentative Vorgänge aufzufassen, woraus verständlich wird, dass bei beiden eine starke p_H -Abhängigkeit besteht. Das Bildungsoptimum des Kallidins liegt bei $p_H = 7$. In stärker saurem Medium tritt keine Inaktivierung ein, während in stärker alkalischen Bereich das Kallidin geschädigt wird. Die Inaktivierung ist irreversibel.

3. Vorkommen des Kallidininaktivators

Der Kallidin-Inaktivator ist im Organismus weit verbreitet. Ausser in Extrakten aus Herz- und Skelettmuskeln, sowie aus Leber, Lunge, Gehirn, Milz, Niere, Pankreas und Lymphdrüsen (7) kann er auch im Blutserum nachgewiesen werden.

Die einzelnen Kallikreinpräparate enthalten wechselnde Mengen Inaktivator. Besonders reich an Inaktivator ist das aus Pankreas dargestellte Kallikrein. Wird Pankreaskallikrein mit Serum versetzt, so lässt sich am isolierten Meerschweinchendarm häufig keine Kallidinentwicklung feststellen, da sofort nach der Freilegung des Kallidins eine Inaktivierung erfolgt.

4. Pharmakologische und chemische Eigenschaften des Kallidins

Kallidin bewirkt wie Kallikrein eine über eine gewisse Zeit anhaltende Senkung des Blutdrucks und erregt Organe mit glatter Muskulatur, wie Darm und Uterus, zur Kontraktion. Vom Kallikrein unterscheidet es sich durch seine Aktivität am Meerschweinchendarm sowie durch seine Kochbeständigkeit, Säureunempfindlichkeit und die Fähigkeit, durch eine Cellulosemembran zu dialysieren. Im Gegensatz zum Kallikrein ist es thermostabil. Von Oxydationsmitteln wird es ebenso wie vom Sauerstoff der Luft zerstört. Kallidin wird von Papain und Trypsin nicht angegriffen, hingegen von Chymotrypsin und der Pilzproteinase Dymal rasch abgebaut. Kathaphorese-Versuche im Bereich von $p_H = 3,5$ bis $p_H = 9$ ergaben eine Wanderung des Kallidins zur Kathode, woraus zu entnehmen ist, dass es sich um eine Base handelt. Auch die Fällbarkeit mit Phosphorwolframsäure spricht für den basischen Charakter des Kallidins. Die gereinigte Substanz gibt starke Biuret- und Ninhydrinreaktion wie Polypeptide. Die Hydrolyse und chromatographische Analyse eines gereinigten Kallidinpräparates zeigte die Anwesenheit mehrerer Aminosäuren (8).

Gegen Stoffe mit ähnlicher pharmakologischer Wirkung wie Histamin, Tyrosin, Vasopressin und Adenylsäure lässt sich Kallidin abgrenzen (9)⁴⁾ mit Ausnahme des von ROCHA E SILVA beschriebenen Bradykinins (10).

⁴⁾ Weitere Literaturstellen s. (12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

5. Bradykinin und Kallidin

Nach ROCHA E SILVA und seinen Mitarbeitern setzt das Gift von *Bothrops jararaca* (wahrscheinlich auf Grund eines proteolytischen Vorgangs) aus Serum eine Substanz frei, die blutdrucksenkend und darmkontrahierend wirkt. Diese pharmakologisch aktive Substanz wurde Bradykinin genannt und ist wie das Kallidin ein Polypeptid. Beide gehören der γ_2 Globulinfraktion des Blutserums an. Das Bradykinin entsteht wie das Kallidin aus einer hochmolekularen, thermolabilen Vorstufe, dem Bradykininogen. Die Bildungsweise und die Eigenschaften dieser beiden Substanzen weisen so starke Ähnlichkeit auf, dass sie höchstwahrscheinlich identisch sind. Zwar konnten E. WERLE und F. PREISSER (11) nachweisen, dass in wässrigen Extrakten aus rotem Rinder-, Schaf- und Pferdeknöchelmark mit Trypsin Bradykinin, nicht aber mit Kallikrein Kallidin entwickelt werden kann; doch scheint dieser Unterschied noch nicht zur Annahme einer Verschiedenheit der beiden Substanzen zu berechtigen. Ausserdem ist eine Reindarstellung dieser beiden aktiven Stoffe bis jetzt noch nicht gelungen.

6. Bildung von Kallidin in der Blutbahn

Kallidin wird nicht nur in vitro sondern auch in der Blutbahn entwickelt. Eine kurze Zeit nach intravenöser Injektion von vier Kallikreineinheiten (in Form von Padutin) entnommene Blutprobe zeigt deutliche Kallidinwirkung am Meerschweinchendarm, die bei einer nach vier Minuten entnommenen Probe maximal ist und bei späteren Entnahmen immer geringer wird, um nach zehn Minuten völlig zu verlöschen. Im menschlichen Blut ist der Kallidinogengehalt nach therapeutischer Dauerinfusion von 40 - 120 Kallikreineinheiten um 30 - 50 % vermindert, weil der Vorrat im Serum rascher verbraucht als ergänzt wird. Diese Tatsache beweist, dass die Kallidinbildung und -inaktivierung nicht nur dem extravasal veränderten Blut zukommt.

Die Inaktivierung des Kallidins in der Blutbahn lässt sich durch Cystein hemmen, das zusammen mit Kallikrein intravenös gegeben wird. In diesem Fall löst eine gegebene Kallikreinmenge eine sehr viel stärkere blutdrucksenkende Wirkung aus. Dadurch ist die Annahme gerechtfertigt, dass die pharmakologische Wirkung des Kallikreins teilweise über das Kallidin zustande kommt.

Die Aufgabe der im folgenden beschriebenen Versuche war:

- I. optimale Bedingungen für die präparative Gewinnung des Kallidinogens und Kallidins ausfindig zu machen;

II. möglichst schonende Methoden zur Reinigung der erhaltenen Präparate zu ermitteln.

Im Abschnitt A wird über Methoden der Kallidinogenanreicherung berichtet und die unter Verwertung der bisher gewonnenen Kenntnisse ausgearbeitete Methode zur Herstellung und Anreicherung von Kallidinogen mit Angaben über Ausbeute und Trockengewicht in einem Schema zusammengefasst.

Im Abschnitt B werden möglichst schonende Versuche zur Gewinnung von Kallidin beschrieben und Untersuchungen über weitere Reinigungsmöglichkeiten angestellt. Am Schluss wird in einem Schema eine ausgearbeitete Methode zur Herstellung einer Kallidinlösung und eines Trockenpräparates mit Angaben über Ausbeute, Trockengewicht und Reinigungsgrad dargestellt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Biologischer Nachweis des Kallidinogens bzw. des Kallidins

Eine qualitative und quantitative Bestimmung des Kallidins ist, da eine spezifische chemische Reaktion fehlt, nur durch den biologischen Test möglich. Die Vorstufe des Kallidins, das Kallidinogen, kann erst, weil pharmakologisch inaktiv, nach Freilegung von Kallidin durch das "Ferment" Kallikrein nachgewiesen werden.

Zur Gewinnung des Testobjektes wurden Meerschweinchen von etwa 250 - 300 g Gewicht durch Nackenschlag getötet. Nach Eröffnung der Bauchdecken wurde das Ileum freipräpariert, herausgenommen, durch sorgfältiges Durchspülen mit Tyrodelösung von seinem Inhalt befreit und in dieser physiologischen Lösung zwei Stunden im Eisschrank belassen. Nach dieser Zeit war der Darm meist "gebrauchsfertig". Ein 2 cm langes Darmstück wurde in einem 20 ml fassenden luftdurchperlten Tyrodebad von 34 - 36 Grad mit einer Hebelübertragung von 1 zu 10 suspendiert. Die Aufzeichnungen erfolgten am Kymographion.

Einen Anhaltspunkt für die Aktivität eines Kallidinpräparates gab der Vergleich mit der von 0,2 ml eines Serum-Kallikrein^{+) -} Ansatzes 1 bis 5 Mi-

+) Eine Kallikrein-Einheit ist nach FREY und KRAUT die Kallikreinmenge, die in 5 ml menschlichem Urin enthalten ist, wenn diese Urinprobe einen Sammelharn von mindestens 50 l entnommen ist.

nuten nach Inkubation ausgelösten Darmkontraktion. Die maximale Kontraktion zum Zeitpunkt maximaler Kallidinentwicklung wurde als eine Kontraktionseinheit festgelegt.

Kriterien des Kallidins

Für die pharmakologische Unterscheidung zwischen Kallidin und anderen darmaktiven Substanzen kommen folgende Kriterien in Frage:

1. Die Inaktivierbarkeit durch Serum.
2. Die Beständigkeit gegen Säuren.
3. Die Thermostabilität.
4. Die Unbeständigkeit gegen Laugen und Oxydationsmittel.

Zum Nachweis der Kallidinaktivität liessen wir die fragliche Lösung 20 - 30 Minuten mit einer entsprechenden Menge Rinderserum stehen. Bei reinen Kallidinpräparaten war die Aktivität nach dieser Zeit am Darm nicht mehr nachweisbar. Beim Kochen mit Säuren wurde Kallidin, soweit es nicht mit oxydierenden Substanzen zusammenkam, nicht angegriffen, während es beim Kochen mit Laugen innerhalb weniger Minuten unwirksam wurde.

A VERSUCHE ZUR ANREICHERUNG VON KALLIDINOGEN

Ausgangsprodukt für die Gewinnung von Kallidinogen war bei allen Versuchen frisches Rinderserum.

1. Fällung von Rinderserum mit Essigsäure

a. Versuchsbeschreibung:

500 ml frisches Rinderserum wurden zunächst mit 750 ml Aqua dest. verdünnt und dann unter ständigem Rühren mit 0,5 % Acidum aceticum glaciale versetzt. Der dabei ausgefallene feinflockige, weisse Niederschlag konnte leicht durch Zentrifugieren von der gelblichgefärbten, überstehenden Lösung getrennt werden.

Aus dem in 100 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmten Niederschlag war es nicht möglich, nach Neutralisation mit 0,1 n Natronlauge durch Inkubation mit Kallikrein, Kallidin freizulegen. Der neutralisierte Überstand hingegen zeigte nach Zugabe von Kallikrein eine beträchtliche Kallidinentwick-

lung. Diese Aktivität blieb nach ein- bis mehrstündiger Inkubationszeit bestehen.

Um die überschüssige Essigsäure aus dem Überstand zu entfernen, wurde er 36 Stunden gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert. Die so gewonnene Lösung war neutral und enthielt Kallidinogen in fast unvermindertem Masse. Nach Inkubation mit der entsprechenden Kallikreinmenge blieb die Aktivität bei den meisten Ansätzen mehrere Tage bestehen und nahm nur langsam wieder ab.

Abbildung 1 zeigt die auf dem Kymographium verzeichneten Kontraktionen des Meerschweinchendarms bei Zusatz von Kallikrein zu Rinderserum.

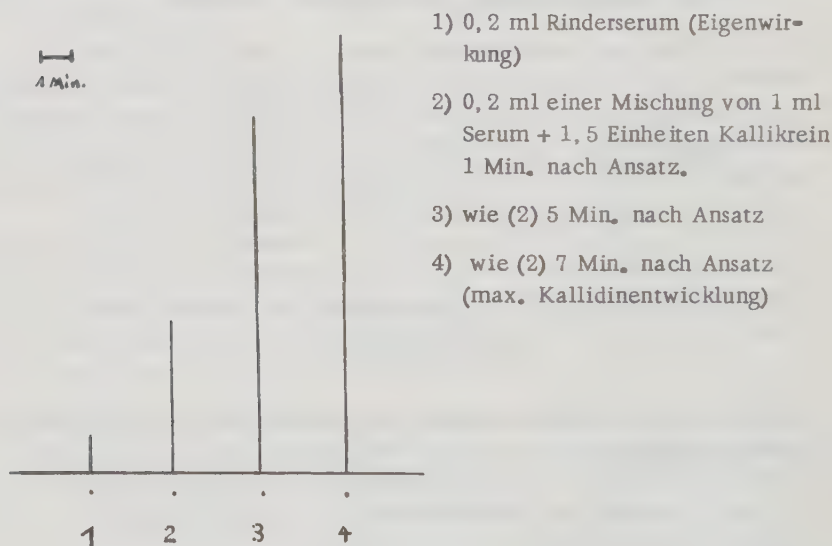


Abbildung 1

Entwicklung von Kallidin in Rinderserum nach Zugabe von Kallikrein.

Abbildung 2 zeigt die Kontraktionen des Meerschweinchendarms nach Zugabe von Kallikrein zu obigen Serum, nachdem es mit 0,5 % Acidum aceticum glac. gefällt und 36 Stunden gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert worden war.

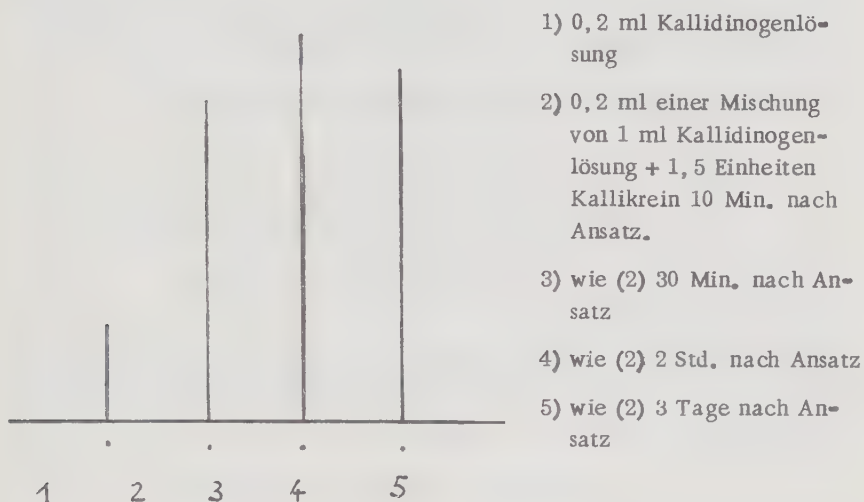


Abbildung 2

Entwicklung von Kallidin aus Rinderserum, das nach Entfernung von Ballast-eiweiss durch Fällung mit Eisessig vorgereinigt war.

b. Ergebnis:

Durch Fällung von Rinderserum mit 0,5 % Acidum aceticum glac. war es möglich, den Kallidininaktivator zu schädigen oder vom Kallidinogen abzutrennen, wodurch die Inaktivierung des Kallidins um mehrere Stunden bis Tage verzögert wurde. Die Kallidinogenausbeute zeigte bei dieser Fällung meist nur geringe Verluste (5 - 10 %). Das Trockengewicht der Kallidinogenlösung betrug 20 mg/ml Lösung, das entspricht einer vierfachen Anreicherung von Kallidinogen, da das Serumtrockengewicht etwa 80 mg/ml beträgt.

Anmerkung:

Wählte man bei der Fällung von Rinderserum mehr als 10 % Eisessig, dann wurde auch nach längerdauernder Dialyse (z.B. 3 Tage) gegen fließendes Brunnenwasser in der überstehenden Lösung eine starke Eigenaktivität beobachtet. Möglicherweise war es durch die Einwirkung der Essigsäure auf die Serumeiweiße zur Bildung einer hochmolekularen, darmaktiven Substanz gekommen. Diese Substanz wurde jedoch nicht näher untersucht.

c. Übersichtsschema der Fällung von Rinderserum mit Essigsäure:

Rinderserum + 150 Vol. % Aqua dest.

+ 0,5 % Acidum aceticum glaciale

Überstand (Dialyse)
(= Kallidinogenlösung)

Niederschlag (verworfen)

Die weitere Anreicherung und Reinigung der durch Fällung mit Essigsäure aus Rinderserum gewonnenen Kallidinogenlösung erfolgte durch fraktionierte Fällung mit Äthanol.

2. Fraktionierte Fällung mit Äthanol

a. Versuchsbeschreibung:

Zu 1000 ml Kallidinogenlösung wurden 40 % Äthanol gegeben und nach einstündigem Stehen im Kühlschrank von dem entstandenen flockigen Niederschlag abzentrifugiert. Dann wurden Überstand und Niederschlag getrennt weiterverarbeitet und auf Kallidinogen geprüft.

Untersuchung des Äthanol-Überstandes:

Die überstehende Lösung wurde durch Eineingung im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre vom Hauptteil des Äthanols befreit. Der restliche Anteil liess sich durch viertägige Dialyse gegen fließendes Brunnenwasser entfernen. Der Test des Innendialysats am Meerschweinchendarm ergab nach Inkubation mit Kallikrein nur sehr geringe Aktivität. Da es sich aber um eine stark verdünnte Lösung handelte, wurde eine Anreicherung des Kallidinogens durch Fällung mit Aceton versucht. Dabei betrug die Kallidinogenausbeute nur etwa 10 %.

Untersuchung des Äthanol-Niederschlages:

Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in 300 ml Aqua dest. aufgenommen und durch Zugabe von einigen Tropfen Natronlauge in Lösung gebracht. Nach 48 stündiger Dialyse gegen fließendes Brunnenwasser zum Zwecke der Entfer-

nung des überschüssigen Äthanol ergab die Prüfung auf Kallidinogen einen Gehalt von etwa 50 %, während über den Verbleib des restlichen Kallidinogens nichts ausgesagt werden konnte.

Die Lösung wurde nun mit destilliertem Wasser auf 500 ml (Hälfte des Ausgangsvolumens) aufgefüllt und erneut mit 75 % Äthanol versetzt. Es kam dabei zum Ausfall eines Niederschlages, der abzentrifugiert, und da er fast kein Kallidinogen enthielt, verworfen wurde. Dagegen wurde in dem Überstand ein Kallidinogengehalt von etwa 20 % festgestellt.

b. Ergebnis:

Durch fraktionierte Fällung einer Kallidinogenlösung mit Äthanol konnte eine Abtrennung von verunreinigenden Begleitsubstanzen erzielt werden. Die Endausbeute an Kallidinogen war jedoch gering. Wahrscheinlich wird ein Teil des Kallidinogens durch Äthanol denaturiert.

Es wäre noch zu untersuchen inwieweit die Verluste an Kallidinogen durch Arbeiten bei tiefer Temperatur z. B. durch Vorkühlen des Serums auf 0° und des Äthanol auf -10° -20° vermindert werden können.

Trotz des geringen Gehaltes an Kallidinogen wurde aus dem Äthanolfraktionspräparat versucht:

a) Herstellung eines Trockenpräparates

Versuchsbeschreibung:

100 ml des durch Fraktionierung mit Äthanol gewonnenen Präparates wurden durch dreitägige Dialyse von dem überschüssigen Äthanol befreit. Aus dem Innendialysat wurde nach Einengen im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre eine bräunliche Masse gewonnen. Diese brachten wir in 100 ml Aqua dest. und lösten sie durch Zugabe von einigen Tropfen Natronlauge auf. Die leicht trübe Flüssigkeit war nach Zusatz der entsprechenden Menge Kallikrein nur sehr gering aktiv. Wahrscheinlich war im Verlauf des Trocknungsprozesses ein weiterer Teil des Kallidinogens zerstört worden.

Ergebnis:

Es gelang nicht aus dem Äthanolfraktionspräparat, ein Kallidinogentrockenpräparat herzustellen.

b) Anreicherung mit Aceton

Versuchsbeschreibung:

400 ml des durch Fraktionierung mit Äthanol gewonnenen Präparates wurden 60 Stunden gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert und so vom überschüssigen Äthanol befreit. Der Kallidinogengehalt war nach der Dialyse fast noch unverändert. Erst nach Zugabe von Aceton in grossem Überschuss (1000 ml) kam es zum Ausfall eines milchigweissen Niederschlages, der abzentrifugiert, mit einem Aceton-Äther-Gemisch zu gleichen Teilen aufgerührt, erneut abzentrifugiert und zuletzt mit Äther getrocknet wurde.

Aus dem getrockneten, ursprünglich weissen Pulver entstand im Verlauf des Trocknungsprozesses eine kompakte bräunliche Masse. Diese war im alkalischen Milieu gut löslich und zeigte nach Inkubation mit Kallikrein geringe Aktivität. Die Endausbeute an Kallidinogen betrug etwa 10 %.

Ergebnis:

Nach Fällung eines durch Fraktionierung mit Äthanol gewonnenen Präparates mit Aceton betrug die Endausbeute an Kallidinogen etwa 10 %. Wahrscheinlich wird das Kallidinogen durch die Behandlung mit Aceton und Äther ebenfalls bis zu einem gewissen Grad geschädigt.

c) Fällung mit Kalignost

Versuchsbeschreibung:

100 ml des dialysierten Präparates der Äthanolfraktionierung wurden so lange mit einer gesättigten Lösung von Kalignost in Aqua dest. versetzt, bis kein weiterer Niederschlag mehr ausfiel. Der leicht bräunliche Rückstand wurde von einer wasserklaren Lösung abfiltriert und dann in 100 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt.

Nach dreitägiger Dialyse gegen fließendes Brunnenwasser konnte aus dem dialysierten Niederschlag durch Zugabe von Kallikrein kein Kallidin freigelegt werden. Auch die Inkubation mit Trypsin führte zu keiner Bradykininbildung.

Ergebnis:

Es gelang nicht mit Hilfe von Kalignost, Kallidinogen auszufällen.

3. Adsorptionsversuch an Carbo activatus purissimus siccus (MERCK)

Im folgenden Experiment wurde versucht Kallidinogen an die zur Oberflächen- und Austauschadsorption befähigte Aktivkohle zu adsorbieren.

Versuchsbeschreibung:

200 ml Rinderserum wurden mit 300 ml Aqua dest. verdünnt sowie mit 0,5 % Acidum aceticum glaciale angesäuert. Der hierbei ausgefallene weisse Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. 250 ml dieser überstehenden Lösung wurden nun mit fünf Spatelspitzen Carbo activatus purissimus siccus (MERCK) versetzt, umgerührt, einige Zeit bei Zimmertemperatur belassen und dann zentrifugiert.

Der neutralisierte Kohleüberstand wies nach wie vor einen guten Gehalt an Kallidinogen auf. Es war also wenig oder gar kein Kallidinogen an die Kohle adsorbiert worden, vermutlich weil die Lösung leicht essigsauer war.

Aus dem in Aqua dest. aufgeschwemmten Kohle-Niederschlag liess sich daher durch Eluieren mit 5 % Eisessig kein Kallidinogen gewinnen.

Ergebnis:

Carbo activatus purissimus siccus (MERCK) adsorbiert Kallidinogen aus mit 0,5 % Eisessig gefällttem Serum ($p_H = 4$) nicht oder nur wenig. Man kann aber eine gegebene Kallidinogenlösung durch diese Kohle von Begleitsubstanzen bis zu einem gewissen Grad befreien. Ob darüber hinaus eine Adsorption des Kallidinogens an die Kohle und eine elective Elution mit grösserem Reinigungseffekt möglich ist, wäre noch genauer zu untersuchen.

4. Fällung mit Ammonsulfat

Versuchsbeschreibung:

500 ml Kallidinogenlösung wurden mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Der entstandene feinflockige weisse Niederschlag wurde nach 12 stündigem Stehen im Kühlschrank abzentrifugiert und in 100 ml Aqua dest. aufgeschwemmt. Zur Entfernung des überschüssigen Ammonsulfats wurde die Suspension mehrere Tage gegen fliessendes Brunnenwasser dialysiert. Nach Zusatz der entsprechenden Menge Kallikrein kam es zur Entwicklung von Kallidin. Wie der Test am Meerschweinchendarm zeigte, war die Aktivität gut.

Ergebnis:

Durch Halbsättigung einer Kallidinogenlösung mit Ammonsulfat wurde im Niederschlag eine Ausbeute an Kallidinogen von 25 - 30 % erzielt, der Überstand enthielt kein Kallidinogen.

5. Fällung mit Trichloressigsäure

Versuchsbeschreibung:

In 100 ml Kallidinogenlösung wurden 5 % Trichloressigsäure gegeben und nach einigem Stehen von dem entstandenen geringen weissen Niederschlag abzentrifugiert. In der überstehenden Lösung konnte nach Entfernung der Trichloressigsäure durch Ausschütteln mit Äther durch Zugabe von Kallikrein kein Kallidin freigelegt werden. Aus dem Niederschlag liess sich nach Ätherextraktion und Aufnehmen in wenig Aqua dest. durch Zusatz von Kallikrein kein Kallidin freilegen.

Ergebnis:

Nach Fällung einer Kallidinogenlösung mit Trichloressigsäure war weder im Überstand noch im Niederschlag Kallidinogen nachweisbar. Wahrscheinlich wird das Kallidinogen durch die Trichloressigsäure denaturiert.

6. Fällung mit Kalignost bei verschiedenen p_H

Es sollte in einer Versuchsreihe geprüft werden, ob Kallidinogen mit Kalignost bei einem bestimmten p_H ausfällt.

Versuchsbeschreibung:

Es wurden

1. 50 ml Kallidinogenlösung mit 20 mg Kalignost b. $p_H = 3-4$
2. 50 ml " " 20 mg " " $p_H = 6-7$ und
3. 50 ml " " 20 mg " " $p_H = 9$ versetzt.

Die ausgefallenen Niederschläge wurden jeweils abzentrifugiert, einige Male mit Aceton und Äther extrahiert, in Aqua dest. aufgeschwemmt und anschliessend vier Tage gegen fliessendes Brunnenwasser dialysiert. Weder aus den Niederschlägen noch aus den Überständen, die ebenfalls dialysiert wurden, konnte durch Zugabe von Kallikrein Kallidin freigelegt werden.

Ergebnis:

Der Versuch Kallidinogen mit Kalignost bei verschiedenen p_H auszufällen gelang nicht.

7. Fällung mit Phosphorwolframsäure bei verschiedenen p_H

Versuchsbeschreibung:

Es wurden

1. 50 ml Kallidinogenlösung mit 20 mg PWS⁺) bei $p_H = 3-4$,
2. 50 ml " " 20 mg PWS " $p_H = 5$ und
3. 50 ml " " 20 mg PWS " $p_H = 7$ versetzt.

Die ausgefallenen Niederschläge wurden jeweils abzentrifugiert, mehrmals mit Aceton und Äther ausgewaschen, in je 50 ml dest. Wasser aufgeschwemmt und dann vier Tage gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert. Ebenso wurden die Überstände einer Dialyse unterzogen.

Ergebnis:

Die Testung der einzelnen Dialysate am suspendierten Meerschweinchendarm ergab, dass die Fällung einer Kallidinogenlösung mit Phosphorwolframsäure zu einer weiteren Anreicherung von Kallidinogen führte. Je nach dem Fällungs- p_H liess sich Kallidinogen im Überstand oder im Niederschlag nachweisen. Im stark sauren Bereich fällt das Kallidinogen aus, während es im neutralen Milieu zum grössten Teil in Lösung bleibt. Die Endausbeute betrug bei dem im stark sauren Bereich ausgefallenen Kallidinogen etwa 30 - 40 %.

8. Versuche zur weiteren Reinigung des durch Fällung mit Phosphorwolframsäure ($p_H = 3-4$) gewonnenen Kallidinogenpräparates

a) Herstellung eines Acetontrockenpulvers

Es wurde versucht durch Herstellung eines Acetontrockenpulvers das Kallidinogen für beliebig lange Zeit haltbar zu machen.

Versuchsbeschreibung:

Ein Kallidinogen-Phosphorwolframsäure-Niederschlag, gewonnen aus 50 ml Kallidinogenlösung, wurde 3 - 4 mal mit je 100 ml eines Aceton-Äther-Gemisches, im Verhältnis 3 : 1, ausgewaschen und dann mit Äther getrocknet. Nach Auflösen des Trockenpulvers in 50 ml Aqua dest. und folgender Inkubation mit Kallikrein entwickelte sich nur eine sehr geringe Darmaktivität. Die Endausbeute an Kallidin betrug etwa 20 %. Die Ursache des grossen Verlustes an Kallidinogen konnte nicht festgestellt werden. Möglicherweise wurde im Verlauf des Trocknungsprozesses durch die Einwirkung des Aceton-

Äther-Gemisches ein Teil des Kallidinogens denaturiert.

Erwartungsgemäss liess sich aus dem Aceton-Äther-Gemisch nach Abdampfen im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre durch Kallikrein kein Kallidin freilegen.

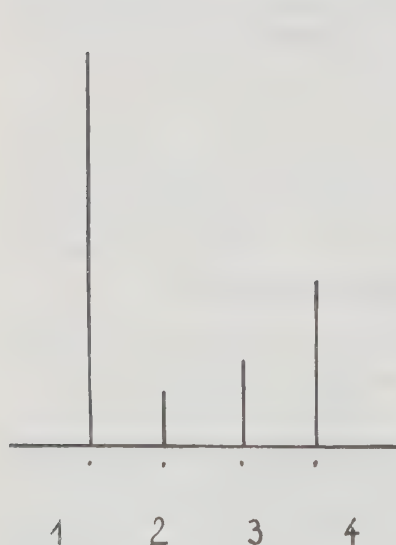
Ergebnis:

Die Herstellung eines Acetontrockenpräparates aus mit Phosphorwolframsäure gefälltem Kallidinogen ergab ein Pulver von sehr geringem Kallidinogengehalt. Die Endausbeute betrug nur etwa 20 %.

Abbildung 4 zeigt

- a) die Kontraktionen des isolierten Meerschweinchendarms bei Zusatz von Kallikrein zu einer Kallidinogenlösung 2 Tage nach Ansatz und
- b) die Kallidinentwicklung nach Zusatz von Kallikrein zu der Lösung eines Acetontrockenpräparates, das aus einem Kallidinogen-Phosphorwolframsäure-Niederschlag einer Kallidinogenlösung hergestellt wurde.

Die einzelnen Ausschläge wurden hervorgerufen durch:



- 1) 0,2 ml einer Mischung von 1 ml Kallidinogenlösung und 1,5 Einheiten Kallikrein (Padutin) 2 Tage nach Ansatz
- 2) 0,4 ml der Lösung des gereinigten Acetontrockenpräparates + 1,5 mg Einheiten Kallikrein 5 Min. nach Ansatz (0,4 ml entspr. d. Ausgangsvolumens)
- 3) wie (2) 15 Min. nach Ansatz
- 4) wie (2) 1 Stunde nach Ansatz

Abbildung 4

Im nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob das mit Phosphorwolframsäure gefällte Kallidinogen, nach Entfernung der überschüssigen Säure durch Dialyse, durch Fällung mit Ammonsulfat (Halbsättigung) weiter angereichert werden kann.

b) Fällung mit Ammonsulfat

Versuchsbeschreibung:

Durch 2 tägige Dialyse gegen fliessendes Brunnenwasser wurde der in 50 ml Aqua dest aufgeschwemmte Kallidinogen-Phosphorwolframsäure-Niederschlag von der überschüssigen Säure befreit. Nach Abzentrifugieren eines gelblichen Niederschlages zeigte eine dem Überstand entnommene Probe, dass sich das Kallidinogen wieder in Lösung befand. Der Überstand wurde so dann mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt, der hierbei entstandene Niederschlag wurde nach 12 stündigem Stehen im Kühlschrank abzentrifugiert und in 100 ml Aqua dest. gelöst. Zur Entfernung des Ammonsulfats wurde die Lösung mehrere Tage gegen fliessendes Brunnenwasser dialysiert. Nach Inkubation mit der entsprechenden Kallikreinmenge kam es zur Entwicklung von Kallidin. Der Test am suspendierten Meerschweinchendarm zeigte beim Vergleich mit Rinderserum eine Endausbeute an Kallidinogen von 20 - 25 %.

Abbildung 5 zeigt als Vergleich die auf dem Kymographion verzeichneten Kontraktionen des isolierten Meerschweinchendarms bei Zusatz von Kallikrein zu frischem Rinderserum und daneben die Kontraktionen des Darms nach Zugabe von Kallikrein zu dem, mit Ammonsulfat weiter gereinigten Kallidinogen-Phosphorwolframsäure-Präparat.

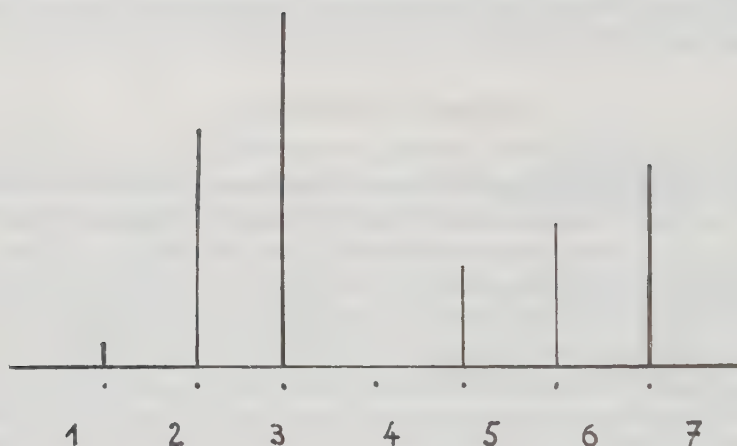


Abbildung 5

Die einzelnen Ausschläge:

- 1) Eigenaktivität des Serums (0,2 ml)
 - 2) 0,2 ml einer Mischung von 1 ml Serum + 1,5 Einheiten Kallikrein 1 Minute nach Ansatz
 - 3) wie (2) nach 5 Minuten
 - 4) 0,4 ml der dialysierten Ammonsulfatlösung (Eigenaktivität)
 - 5) 0,4 ml einer Mischung von 1 ml Ammonsulfatlösung + 3 Einheiten Kallikrein 5 Minuten nach Ansatz
 - 6) wie (5) 15 Minuten nach Ansatz
 - 7) wie (5) 1 Stunde nach Ansatz
- 0,2 ml Serum entsprechen 0,4 ml der Ammonsulfatlösung.

Ergebnis:

Ein in Aqua dest. suspenderter Kallidinogen-Phosphorwolframsäure-Niederschlag wurde nach Entfernung der Säure durch Dialyse erneut mit Ammonsulfat gefällt und so eine weitere Abtrennung von verunreinigenden Ballaststoffen erzielt. Es wurde eine Reinigung auf das 160-fache erreicht. Die Endausbeute an Kallidinogen betrug 20 - 25 %.

Unter Berücksichtigung der bei den oben beschriebenen Reinigungsversuchen gewonnenen Gesichtspunkte wurde ein Verfahren zur präparativen Gewinnung von Kallidinogen ausgearbeitet, dessen einzelne Stufen im folgenden Schema zusammengefasst sind.

9. Schema zur Gewinnung eines Kallidinogenpräparates mit Angaben von Ausbeute, Trockengewicht und Reinheitsgrad

Rinderserum 150 Vol. % Aqua dest.
+ 0,5 % Acidum aceticum glaciale

Niederschlag (verworfen)	Überstand (Kallidinogenlösung) + 40 mg % Phosphorwolframsäure ($p_H = 3$)

	Niederschlag Überstand
	(aufgelöst in (verworfen)
	Wasser und dialy-
	siert)
	+ Ammonsulfat
	(Halbsättigung)

	Niederschlag Überstand
	(in Aqua dest.
	gelöst und dia-
	lysiert

In der folgenden Übersicht sind die Trockengewichte, Reinigungseffekte und Ausbeuten nach den einzelnen Fällungen der obigen Methode zur Gewinnung eines Kallidinogenpräparates zusammengestellt.

Fällung von Rinderserum mit	Trockengewicht	Reinigungseffekt	Ausbeute
1. 0,5 % Eisessig	20 mg/ml Serum	4-fach	80 - 95 %
2. Phosphorwolframsäure $p_H=3$	4 mg/ml Serum	20-fach	30 - 50 %
3. Ammonsulfat (Halbsättigung)	0,5 mg/ml Serum	160-fach	15 - 25 %

B VERSUCHE ZUR GEWINNUNG VON KALLIDIN- PRÄPARATEN

1. Darstellung von Kallidin aus Rinderserum

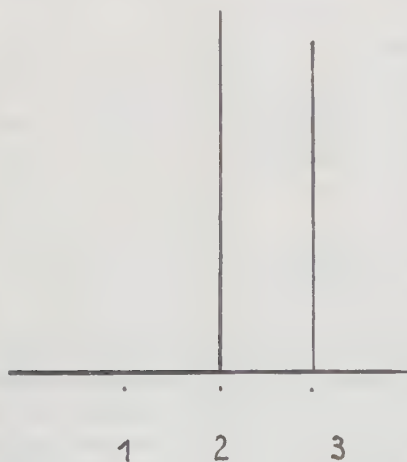
Frisches Rinderserum wurde zwecks Abtrennung aller niedermolekularen, dialysablen Stoffe org und anorg. Natur, insbesondere solcher von ähnlicher Wirkung wie Kallidin- Adenylsäure, Tyramin, Serotonin, Histamin, Cholin und Acetylcholin, welche dem Serum eine gewisse Eigenaktivität verleihen - 48 Stunden gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert. Ein dabei ausgefallener Niederschlag fibrinoider Natur wurde, da er kein Kallidinogen enthielt, abzentrifugiert und verworfen. Sodann wurden 100 ml dialysiertes Rinderserum mit 150 ml Aqua dest. verdünnt und mit 1,25 Acidum aceticum glaciale versetzt. Der dabei ausgefallene kompakte, weisse Niederschlag wurde abzentrifugiert, und da er, wie bereits bei früheren Versuchen festgestellt, von Kallidinogen frei war, verworfen.

Anschließend wurde der Überstand mit den entsprechenden Kallikreinmenge inkubiert und etwa 20 Minuten bei Zimmertemperatur belassen, wobei das p_H der Inkubationslösung bei 3 - 4 lag. Das hatte den Vorteil, dass bei diesem p_H die Kallidinentwicklung, wenn auch verlangsamt, eintrat nicht aber die Kallidininaktivierung. Die laufende Kontrolle des freigelegten Kallidins erfolgte am isolierten Meerschweinchendarm. Zu diesem Zweck musste jedoch die Lösung mit Natronlauge neutralisiert werden.

Nach etwa 20 Minuten war das Maximum der Kallidinentwicklung erreicht. Nun wurde mit 4 ml einer 40 prozentigen Trichloressigsäure-Lösung enteiwesst. Der dabei ausgefallene feinflockige, weisse Niederschlag wurde abzentrifugiert und da er kein Kallidin enthielt, verworfen.

Um den Überstand von der überschüssigen Säure zu befreien, wurde er 5 bis 6 mal mit dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt. Auf diese Weise wurde die Trichloressigsäure praktisch vollkommen entfernt. Durch Einengen im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre wurde der überschüssige Äther vertrieben. Die so erhaltene, leicht gelblich gefärbte Kallidinlösung wurde in der Kühltruhe eingefroren und blieb über mehrere Wochen fast unverändert aktiv.

Abbildung 6 zeigt zum Vergleich die auf dem Kymographion verzeichneten Kontraktionen des isolierten Meerschweinchendarms bei Zusatz von Kallikrein zu dialysiertem Rinderserum und die Kontraktionen des Darms durch die Standard-Kallidinlösung.



Bedeutung der einzelnen Ausschläge:

- 1) 0,2 ml dialysiertes Rinderserum
- 2) 0,2 ml einer Mischung von 1 ml Serum + 1,5 Einheiten Kallikrein 5 Min. nach Ansatz (= max. Kallidinentwicklung)
- 3) 0,4 ml Kallidinlösung (das Volumen von 0,4 ml Kallidinlösung entspricht dem von 0,2 ml Serum)

Abbildung 6

Wie aus dem Vergleich der einzelnen Ausschläge der obigen Abbildung zu ersehen ist, betrug die Kallidinausbeute 40 - 50 %. Dass es sich in der Tat um Kallidin handelte, ergab sich aus einem Inaktivierungsversuch mit Rinderserum (Abbildung 7).

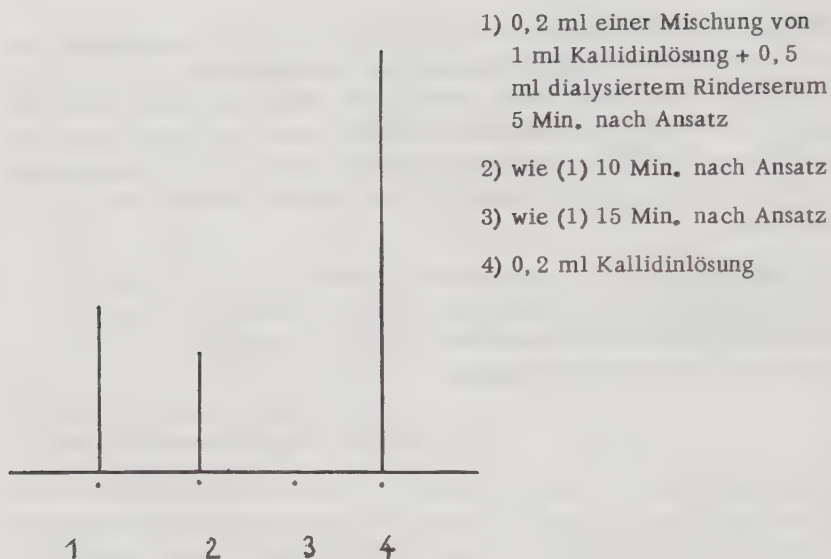


Abbildung 7

Inaktivierung der Kallidinlösung durch Rinderserum.

Ergebnis:

Die Fällung von dialysiertem Rinderserum mit 0,5 % Eisessig und anschließende Enteiweißung mit 2 % Trichloressigsäure zum Zeitpunkt max. Kallidinentwicklung ergab eine Kallidinlösung mit einem Kallidingehalt von etwa 40 - 60 %. Eingefroren in der Kühltruhe war die Lösung mehrere Wochen haltbar. Das festgestellte Trockengewicht ergab für 1 ml Serum 14,8 mg org. und 14,4 mg anorg. Substanz.

Übersichtsschema zur Gewinnung einer Kallidinlösung

Dialys. Rinderserum + 150 Vol. % Aqua dest.
+ 0,5 % Acidum aceticum glaciale

Niederschlag (verworfen)	Überstand + Kallikrein (max. Kallidinentwicklung) + 2 % Trichloressigsäure
-----------------------------	--

Niederschlag (verworfen)	Überstand Ätherextraktion = Kallidinlösung
-----------------------------	--

2. Weitere Reinigung der Kallidinlösung durch Fällung mit Kalignost und Aceton

Zu 100 ml Kallidinlösung wurde so lange von einer gesättigten Kalignostlösung zugegeben, bis kein weiterer Niederschlag mehr ausfiel. Nach mehrstündigem Stehen in der Kühltruhe wurde ein feinflockiger weisser Niederschlag von der überstehenden Lösung getrennt. Dieser wurde mehrere Male mit einem Aceton-Äther-Gemisch extrahiert. Das so gewonnene feine, weisse Pulver liess sich nur schwer wieder in Aqua dest. lösen. Der Test am suspendierten Meerschweinchendarm zeigte eine geringe Aktivität. In dem Aceton-Äther-Gemisch war nach Einengung im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre ebenfalls Kallidin nachweisbar. In der überstehenden Lösung der Kalignostfällung war nach Ausschütteln mit Äther und Neutralisation mit 0,1 n Natronlauge keine Aktivität nachweisbar.

Ergebnis:

Kallidin ist mit Kalignost fällbar. Allerdings war nach Extraktion des Niederschlages mit einem Aceton-Äther-Gemisch Kallidin sowohl im Extrakt als auch im Niederschlag nachweisbar. Die Endausbeute an Kallidin war jedoch gering. Möglicherweise wird Kallidin durch die Behandlung mit Aceton-Äther-Gemisch geschädigt.

Es sollte nun geprüft werden, inwieweit das Kallidin durch Trichloressigsäure geschädigt wird.

3. Einfluss der Trichloressigsäure auf die Kallidinausbeute

Versuchsbeschreibung:

Es wurden

- | | | | |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------|
| 1. 250 ml Dkgen-Lös. | +) + 600 E. KE ⁺⁺) | + (n. 60') 25 ml TCA ^{x)} | (49 %), |
| 2. 250 ml " | + 600 E. " | + (n. 60') 7,5 ml TCA | (49 %), |
| 3. 250 ml " | + 600 E. " | + (n. 60') 5,0 ml TCA | (49 %)u. |
| 4. 250 ml " | + 600 E. " | + (n. 60') 2,5 ml TCA | (49 %) |
- versetzt.

Die ausgefallenen Niederschläge wurden jeweils abzentrifugiert, und da sie, wie bereits früher festgestellt, kein Kallidin enthalten, verworfen.

Durch Ausschütteln mit Äther konnten die Überstände zum Teil von der überschüssigen Trichloressigsäure befreit werden ($p_H = 6$). Der Rest der Säure wurde mit 0,1 n Natronlauge neutralisiert. Der restliche Äther liess sich unter Einengung im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre vertreiben.

Die Testung der einzelnen Kallidinüberstände ergab, dass bei:

1. die gewonnene wasserklare Lösung gut darmaktiv war. Der Verlust an Kallidin betrug jedoch 60 %.
2. Auch hier war der Verlust an Kallidin fast gleich gross. Ausserdem war die Lösung infolge einer zu geringen Menge an Fällungsmittel nicht mehr ganz klar.
3. und 4. Die beiden Chargen waren erheblich trüb. Die Kallidinausbeute war bei diesen letzten Fällungen um 10 % besser.

Ergebnis:

Durch Trichloressigsäure wird Kallidin erheblich geschädigt. Die Kallidinverluste nehmen mit steigender Trichloressigsäure Konzentration zu. In wie weit das Kallidin bei der Extraktion mit Äther und anschliessender Einengung im Vakuum geschädigt wird, konnte nicht festgestellt werden.

Zur Gewinnung von reinen Kallidinpräparaten wurden Versuche mit ionenaustauschenden Substanzen durchgeführt.

+) Kallidinogenlösung

++) Kallikrein

X) Trichloressigsäure

4. Kallidin-Adsorptionsversuche mit ionenaustauschenden Substanzen

a) Versuch mit Amberlite IR 4B

Amberlite IR 4B ist ein Anionenaustauscher von schwach basischem Typ.

Versuchsbeschreibung:

In ein Adsorptionsrohr von 10 cm Länge und 2 cm Durchmesser wurde Amberlite IR 4B gefüllt. Dann wurden 200 ml Kallidinlösung⁺⁾ aufgegossen. Die Testung des 1. Durchlaufs am suspendierten Meerschweinchendarm ergab geringe Aktivität. Beim Nacheluieren mit 200 ml dest. Wasser waren die ersten 100 ml gut aktiv, die zweiten weniger gut. Eine Nacheluierung mit 200 ml 0,1 n Salzsäure war wenig aktiv.

Ergebnis:

Amberlite IR 4B adsorbiert Kallidin nur wenig.

b) Versuch mit Amberlite IRC 50

Amberlite IRC 50 ist ein Kationenaustauscher von schwach saurem Typ.

Versuchsbeschreibung:

200 ml Kallidinlösung wurden in eine Amberlite IRC 50-Säule gefüllt und mit geringer Tropfgeschwindigkeit durchlaufen gelassen.

Die Testung der einzelnen Fraktionen war infolge starker Erhöhung der Aktivität nach dem Durchlauf durch die Säule schwer.

Ergebnis:

Der Versuch Kallidin an Amberlite IRC 50 zu adsorbieren, erbrachte infolge starker Erhöhung der Aktivität aus unbekannter Ursache keine klaren Ergebnisse.

5. Darstellung einer Kallidinlösung aus Rinderserum durch Fällung mit Trichloressigsäure

Versuchsbeschreibung:

1000 ml frisches Rinderserum wurden zwecks Abtrennung aller niedermolekularen Substanzen 36 Stunden gegen fließendes Brunnenwasser dialysiert. Ein hierbei ausgefallener fibrinöider Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen.

+) Für diese Versuche wurde eine, nach dem auf Seite 28 beschriebenen Verfahren hergestellte, Kallidinlösung verwandt.

Das dialysierte Serum wurde nun mit der entsprechenden Menge Kallikrein versetzt und die Kallidinentwicklung fortlaufend am Meerschweinchendarm getestet. Zum Zeitpunkt maximaler Kallidinentwicklung (nach 4 Minuten) wurde unter ständigem kräftigem Rühren 5 % einer 100 prozentigen Trichloressigsäure hinzugefügt. Es kam dabei zum Ausfall eines gelblichen Niederschlages, der nach 2 stündigem Stehen in der Kühltruhe von einer wasserklaren Lösung abzentrifugiert werden konnte.

Die überschüssige Säure wurde im Extraktionsapparat mit Äther entfernt ($p_H = 6$). Der Rest der Säure wurde mit 0,1 n Natronlauge neutralisiert. Der in der Lösung befindliche Äther liess sich leicht im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre vertreiben. Aus der Aktivitätsbestimmung am Meerschweinchendarm ergab sich, dass die Kallidinlösung gut darmaktiv war. Die Ausbeute lag bei etwa 40 - 45 %.

Dass es sich in der Tat um Kallidin handelte, konnte ein Inaktivierungsversuch mit Serum beweisen. Es war jedoch auffallend, dass es zu keinem völligen Abbau der Aktivität kam und die Inaktivierung sich über zwei Stunden erstreckte.

Ergebnis:

Wie durch mehrere Versuche bestätigt wurde, war es möglich, durch Fällung mit 5 % Trichloressigsäure zum Zeitpunkt max. Kallidinentwicklung eine wasserklare farblose Kallidinlösung zu erhalten. Die Ausbeute an Kallidin betrug 40 - 50 %. Die Trockengewichtsbestimmung ergab 73 mg org. und 6,7 mg anorg. Substanz pro ml Rinderserum. Die unter Toluol im Kühlschrank aufbewahrte Kallidinlösung konnte ca. 4 Wochen ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Im folgenden Schema sind die einzelnen Schritte zur Herstellung einer Kallidinlösung nochmals zusammengefasst.

Schema zur Herstellung der Kallidinlösung

Dialy. Rinderserum + entsprechende Menge Kallikrein

+ 5 % Trichloressigsäure (100 %ige)
(Zum Zeitpunkt max. Kallidentwicklung)

Niederschlag
(verworfen)

Überstand
mit Äther extrahieren, restliche Säure mit
0,1 n Natronlauge neutralisieren, Äther
im Vakuum vertreiben. (= Kallidinlösung)

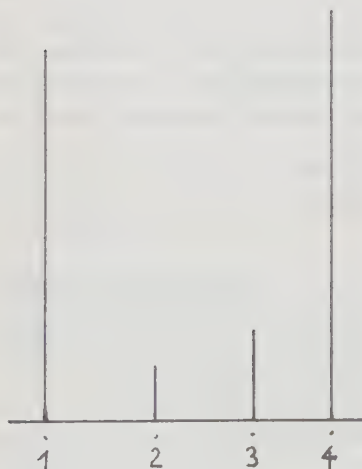


Abbildung 8

Aktivität der Kallidinlösung und Inaktivierung der Kallidinlösung.

- 1) 0,1 ml eines Serum-Kallikrein-Ansatzes zum Zeitpunkt max. Kallidentwicklung.
- 2) 0,3 ml einer Mischung aus 1 ml Kallidinlösung und 0,5 ml dialysiertes Serum 2 Stunden nach Ansatz.
- 3) wie (2) 3 Stunden nach Ansatz.
- 4) 0,2 ml Kallidinlösung.

6. Weitere Reinigungsversuche der Kallidinlösung

a) Fällung mit Phosphorwolframsäure

Versuchsbeschreibung:

100 ml der Kallidinlösung wurden mit 5 % konz. Schwefelsäure versetzt und tropfenweise Phosphorwolframsäure (10 g gelöst in 10 ml 5 prozentiger Schwefelsäure) zugegeben, bis kein weiterer Niederschlag mehr entstand und sich in der Lösung etwa 2 % überschüssige Phosphorwolframsäure befanden.

Die nach 2 stündigem Stehen im Kühlschrank abzentrifugierte und mit 5 prozentiger Schwefelsäure ausgewaschene Fällung wurde durch gelöstes Barythydrat zerlegt. Dabei bildete sich unlösliches Bariumphosphorwolframat, während die Basen mit überschüssigem Baryt in die wässrige Lösung gingen. Durch Neutralisation mit Schwefelsäure konnte die Lösung vom restlichen Barium befreit werden.

Ergebnis:

Wie bereits in früheren Versuchen festgestellt, ist Kallidin mit Phosphorwolframsäure fällbar. Dabei werden eine Reihe verunreinigender Ballaststoffe abgetrennt. Durch die Fällung mit Phosphorwolframsäure kam es zu keinen wesentlichen Verlusten an Kallidin.

b) Fällung mit Aceton

Versuchsbeschreibung:

Hierzu wurden 50 ml der Kallidinlösung mit der fünffachen Menge Aceton unter Rühren versetzt, der dabei entstandene milchigweisse Niederschlag abzentrifugiert, mit einem Aceton-Äther-Gemisch zu gleichen Teilen aufgerührt, erneut abzentrifugiert und zuletzt mit Äther getrocknet.

Aus 50 ml Kallidin-Lösung wurden auf diese Weise 0,2 g eines weissen Pulvers gewonnen. Die in wenig Aqua dest. gelöste Substanz war am suspendierten Meerschweinchendarm sehr wenig aktiv.

Dagegen wurde in der überstehenden Lösung der Acetonfällung nach Abdampfen des Acetons im Vakuum unter Stickstoffatmosphäre eine beträchtliche Aktivität festgestellt. Der eingeeengte Acetonüberstand hatte ein p_H von 7,5 - 8 und war nach Neutralisation mit 0,1 ml am Darm stark aktiv. 0,3 ml dieser Lösung entsprachen 0,1 ml der Kallidinlösung. Die Inaktivierung dieser Lösung durch Serum erfolgte innerhalb 10 Minuten.

Es sollte nun die Herstellung eines Trockenpulvers versucht werden. Nach Einengung der kallidinhaltigen Lösung bis zur Trockne konnte ein sprödes, gelbliches Pulver von 130,2 mg gewonnen werden. 10 mg dieser Trockensubstanz wurden in 2 ml dest. Wasser wieder aufgenommen. Hierbei zeigte sich, dass das p_H bei 8 lag. Leider konnte die Ursache dieser alkalischen Reaktion nicht geklärt werden. In einem 2. und 3. Versuch trat diese Alkalität ebenfalls auf.

Die Aktivitätsbestimmung am suspendierten Meerschweinchendarm zeigte, dass 0,6 mg der gelösten Trockensubstanz einer Kontraktionseinheit⁺⁾ entsprechen.

Ergebnis:

Die Fällung der Kallidinlösung mit der fünffachen Menge Aceton ergab, dass etwa ein Drittel des Kallidins ausgefällt wird, während der Rest zum grössten Teil in der überstehenden Lösung verbleibt. Ein aus dem Acetonüberstand gewonnenes Trockenpräparat zeigte gute Aktivität. Die Endausbeute an Kallidin betrug etwa 15 - 20 %. Das festgestellte Trockengewicht ergab 2,2 mg org. und 0,4 mg anorg. Substanz pro ml Serum.

c) Adsorption an Carbo activatus purissimus siccus (MERCK)

Der bereits oben beschriebene Versuch mit der zur Oberflächen- und Austauschadsorption befähigten Aktivkohle wurde mit vorgereinigtem Kallidin noch einmal unternommen.

Versuchsbeschreibung:

Zu 50 ml Kallidinlösung wurden 100 mg Carbo activatus purissimus siccus (MERCK) gegeben und nach mehrmaligem Umschütteln 12 Stunden im Eisschrank belassen. Nach dem Abzentrifugieren des Kohle-Niederschlags wurde eine klare Lösung erhalten, in der keine Aktivität mehr nachweisbar war. Also war das gesamte Kallidin an die Kohle adsorbiert.

1. Elution mit Salzsäure

Die Elution wurde zunächst mit 1 n Salzsäure versucht. Zu diesem Zweck wurde der Kohle-Niederschlag mit 10 % 1 n Salzsäure verrührt, abzentrifugiert und mehrmals mit der Elutionslösung ausgewaschen. Die Testung des mit Natronlauge neutralisierten Eluats liess eine geringe Aktivität erkennen, die jedoch nicht auf Kallidin zurückzuführen war.

+) Siehe Seite 15 unten.

Auch eine zweite Elution mit 20 % 1 n Salzsäure erbrachte nicht den gewünschten Erfolg.

2. Elution mit Eisessig

Der Versuch, das Kallidin mit 10 prozentigem Acidum aceticum glaciale zu eluieren, führte ebenfalls zu keinem Erfolg.

Ergebnis:

Das Kallidin wird von Carbo activatus purissimus siccus (MERCK) quantitativ adsorbiert, lässt sich aber mit 10 prozentiger und 20 prozentiger 1,0 n Salzsäure und 10 prozentigem Eisessig nicht eluieren.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Eingangs werden in einem kurzen Überblick die bisherigen Kenntnisse über das Kallidin und seine Beziehungen zum Kallikrein dargelegt.
2. Im experimentellen Teil werden zunächst die im folgenden zusammengefassten Versuche zur präparativen Gewinnung von Kallidinogen aus Rinderserum beschreiben.
 - a) Durch Fällung von Rinderplasma mit 0,5 % Eisessig wird unter Erhaltung des Kallidinogens der Kallidinaktivator geschädigt oder vom Kallidinogen abgetrennt. Die Ausbeute an Kallidinogen beträgt 90 - 95 % bei einem 4-fachen Reinigungseffekt. Die so erhaltene Lösung bezeichnen wir als Kallidinogenlösung.
 - b) Durch fraktionierte Fällung einer Kallidinogenlösung mit Äthanol wird eine Abtrennung von verunreinigenden Begleitsubstanzen erzielt. Die Endausbeute an Kallidinogen ist dabei sehr gering. Wahrscheinlich wird ein Teil des Kallidinogens durch Äthanol denaturiert.
 - c) Kallidinogen wird aus mit Eisessig gefälltem Serum ($p_H = 4$) an Carbo activatus purissimus siccus (MERCK) nur zu einem geringen Teil adsorbiert. Jedoch wird die Kallidinogenlösung durch die Kohle bis zu einem gewissen Grad von Begleitsubstanzen befreit.
 - d) Durch Halbsättigung einer Kallidinogenlösung mit Ammonsulfat wird im Niederschlag eine Ausbeute an Kallidinogen von 25 - 30 % erzielt. Der Rest bleibt im Überstand.

- e) Nach Fällung einer Kallidinogenlösung mit 5 % Trichloressigsäure ist weder im Überstand noch im Niederschlag Kallidinogen nachweisbar. Kallidinogen wird durch Trichloressigsäure irreversibel denaturiert.
 - f) Kallidinogen kann aus einer Kallidinogenlösung mit Kalignost nicht ausgefällt werden.
 - g) Kallidinogen wird mit Phosphorwolframsäure aus einer Kallidinogenlösung im stark sauren Milieu ausgefällt, während es im neutralen Bereich zum grössten Teil in Lösung bleibt. Die Endausbeute an Kallidinogen betrug dabei 30 - 40 %.
 - h) Die weitere Reinigung eines Kallidinogen-Phosphorwolframsäure-Präparates mit Aceton erbrachte nur geringe Ausbeute an Kallidinogen, während durch die Fällung mit Ammonsulfat (Halbsättigung) eine Reinigung auf das 160-fache erzielt wird. Die Endausbeute an Kallidinogen betrug dabei 20 - 25 %.
 - i) In einem Schema werden die einzelnen Stufen einer Kallidinogenfraktionierung dargestellt mit Angaben über Trockengewichte, Ausbeuten und Reinheitsgrade.
3. Im Teil 2 der Arbeit werden Versuche zur präparativen Gewinnung von Kallidin beschrieben sowie weitere Reinigungsversuche der erhaltenen Präparate.
- a) Die Fällung von dialysiertem Rinderserum mit 0,5 % Eisessig und 2 % Trichloressigsäure ergibt eine Kallidinlösung mit einem Gehalt an Kallidin von etwa 40 - 60 %, nach Zugabe von Kallikrein zur Kallidinogenlösung.
 - b) Der Versuch, Kallidin mit Kalignost auszufällen, zeigte, dass Kallidin zwar mit Kalignost fällbar ist, aber die Endausbeute an Kallidin dabei sehr gering bleibt.
 - c) Die Untersuchung des Einflusses der Trichloressigsäure auf Kallidin erbrachte, dass das Kallidin erheblich geschädigt wird.
 - d) Die Adsorption von Kallidin aus einer wässrigen Kallidinlösung an Amberlite IR 4B und IRC 50 gelingt nicht oder nur wenig.
 - e) Es wird eine weitere Methode zur Gewinnung einer Kallidinlösung angegeben; Durch Fällung mit 5 % Trichloressigsäure zum Zeitpunkt maximaler Kallidinentwicklung erhält man eine wasserklare farblose

Kallidinlösung. Nach Extraktion der überschüssigen Säure mit Äther beträgt die Endausbeute an Kallidin im Durchschnitt 35 - 50 %.

- f) Die weitere Reinigung der Kallidinlösung mit Phosphorwolframsäure bzw. Aceton zeigte die Überlegenheit der Phosphorwolframsäure als Fällungsreagenz. Bei Fällung mit Aceton ist Kallidin sowohl im Überstand als auch im Niederschlag nachweisbar.
- g) Kallidin wird an Carbo activatus purissimus siccus (MERCK) quantitativ adsorbiert, lässt sich aber mit 1 n Salzsäure und 10 prozentigem Eisessig nicht eluieren.

LITERATURVERZEICHNIS

	Zitat Nr.	Seite
Andrade, S. u. Rocha e Silva, M.: Biochem.J. 64, 701-704 (1957)	12	12
Brehm, W., Ehrlicher, R. u. Kehl, R.: Inaugural-dissert. München (1951)	5	11
Frey, E.K. u. Kraut, H.: Biochem. Zeitschr. 157, 32 (1926)	24	9
Frey, E.K. u. Kraut, H.: Biochem. Zeitschr. 175, 97 (1928)	25	9
Frey, E.K., Kraut, H. u. Bauer, E.: Biochem. Zeitschr. 198, 97 (1930)	22	9
Frey, E.K., Kraut, H., Bauer, E. u. Schultz, F.: Biochem. Zeitschr. 205, 99 (1932)	23	9
Frey, E.K., Kraut, H. u. Werle, E.: Kallikrein, Ferd. Enke Verlag, Stuttgart (1950)	1	9
Gaddum, J. H.: Polypeptides, E. & S. Livingstone LTD. Edinburgh a. London (1955)	20	12
Guggenheim, M.: Die biogenen Amine, 4. Aufl. Verlag S. Karger, Basel u. New York (1951)	21	22
Holdenstock, D., J., Mathias, A.P. u. Schachter, M.: Brit. J. Pharmacol. 12, 149 (1957)	16	12
Kraut, H., Frey, E.K. u. Werle, E.: Zeitschr. f. phys. Chemie 192, 1 (1930)	6	11
Prado Eline, S., Wilson, T., Beraldo u. Rocha e Silva, M.: Arch. of Biochem. 27, 410 (1950)	15	12
Rocha e Silva: Journal of Phys. 488, 109 (1949)	10	12
Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G.: Amer. J. Phys. 156, 261-273 (1949)	14	12

	Zitat Nr.	Seite
Werle, E.:		
Klin. Wochenschr. 1936, 848	26	9
Werle, E.:		
Tagungsberichte Angew. Chemie (1948), 51	27	9
Werle, E.:		
Vortrag vor d. Morphol. Ges. München 1950	17	12
Werle, E. u. Berek, U.:		
Biochem. Zeitschr. 320, 136 (1950)	28	9
Werle, E., Ehrlicher, R., Koebke, K.:		
Biochem. Zeitschr. 322, 27 (1951)	9	12
Werle, E., Forell, M. M., Maier, L.:		
Naturwissenschaften 40, 627 (1954)	2	10
Werle, E., Götze, W. u. Keppler, A.:		
Biochem. Zeitschr. 289, 217 (1937)	3	10
Werle, E. u. Hambüchen, R.:		
Arch. exp. Path. u. Pharma. 201, 311 (1943)	8	12
Werle, E., Kehl, R., Koebke, K.:		
Biochem. Zeitschr. 320, 372 (1950)	18	12
Werle, E., Kehl, R. u. Koebke, K.:		
Biochem. Zeitschr. 321, 213 (1950)	19	12
Werle, E. u. Keppler, A.:		
Biochem. Zeitschr. 289, 217 (1937)	29	9
Werle, E. u. Preisser, F.:		
Klinische Wochenschr. 34, 1042 (1956)	11	13
Werle, E. u. Schwartz, H. J.:		
Klinische Wochenschr. 19, Nr. 11 (1940)	7	12
Willstätter, R., Waldschmidt, E. Leitz u. Dunaiturria, S.:		
Zeitschr. f. phys. Chemie 161, 191 (1926)	4	11

L E B E N S L A U F

Am 29. September 1932 wurde ich als Sohn des Baumeisters Wilhelm Krotsch und seiner Ehefrau Rosemaria, geb. Lauber, in Teplitz-Schönau (CSR) geboren.

Von meinem 6. Lebensjahr ab besuchte ich ein Jahr die Volksschule in Teplitz-Schönau. Nach dem Einmarsch der Deutschen übersiedelten meine Eltern 1938 nach Berlin, wo ich vier weitere Jahre in die Volksschule ging. Infolge der Kriegswirren kam ich 1943 nach Duppau (Sudentenland) in ein Internat. Seit 1945 wohne ich in Bayern. 1953 legte ich an der Wittelsbacher-Oberschule in München die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr begann ich an der Universität München Medizin zu studieren. Nach dem Wintersemester 1955/56 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Oktober 1957 begann ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. E. Werle mit den experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit.

Am 13. April 1959 begann ich in München mit dem Staatsexamen, welches am 1. August 1959 beendet war.

